



ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITOS DA NICOTINA NO METABOLISMO ÓSSEO: CONSEQUÊNCIAS A NÍVEL DA
REGENERAÇÃO ÓSSEA

Francisco Morais Quelhas Lima

Orientador

João Miguel Silva e Costa Rodrigues

Porto 2013

**EFEITOS DA NICOTINA NO METABOLISMO ÓSSEO: CONSEQUÊNCIAS A NÍVEL DA
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Unidade Curricular: Artigo de Revisão Bibliográfica

Autor:

Francisco Morais Quelhas Lima nº 081301032

(FranciscoQuelhasLima@gmail.com)

Aluno do 5º Ano de Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Orientador:

Prof. João Miguel Silva e Costa Rodrigues

Professor Auxiliar Convidado

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto

www.fmd.up.pt

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor João Miguel Silva e Costa Rodrigues, pois aceitou orientar esta revisão, dando-me uma ajuda preciosa para a realização da mesma.

À minha mãe, Teresa Quelhas Lima, por dar luz à minha vida e por estar sempre incondicionalmente do meu lado.

Ao meu pai, Jorge Quelhas Lima, por todo o apoio e presença, dedicação e carinho.

Agradecer também a oportunidade que os meus pais me deram de me tornar médico dentista, superando todas as dificuldades e obstáculos, sabendo que eles estariam sempre do meu lado, apoiando-me.

À minha irmã, Joana Quelhas Lima, por toda a amizade, preocupação e força que me transmitiu.

À Maria da Glória, minha segunda mãe, que sempre me acompanhou e sempre me deu a mão para encarar cada obstáculo de cabeça erguida.

Aos meus familiares, por todo o amor e carinho.

À Mariana Martins, por estes anos de enorme apoio e preocupação, dedicação e amor, dando-me sempre coragem para lutar

À minha amiga Sílvia Santos pela amizade, pela presença, por toda a preocupação e dedicação que tornaram o meu dia-a-dia mais fáceis de encarar.

À minha afilhada de praxe, Joana Cerqueira, por me mostrar o verdadeiro significado de amizade, e por estar do meu lado em qualquer situação.

Aos meus amigos Francisca Oliveira, Mariana Oliveira, Ana Assis, Catarina Ferreira, Sara Ponciano, Ana Araújo, Guilherme Franco e João Reis que contribuíram para o meu crescimento como médico dentista e por todos os momentos de alegria que me proporcionaram durante estes 5 anos.

Ao meu binómio e amigo, Emanuel Cruz, por tudo que passamos durante esta longa caminhada, e por nunca ter desistido desta amizade, estado do meu lado em todos os momentos destes 5 anos académicos.

A todos os meus colegas, de todos os anos, e a todos os meus professores, por tudo que me ensinaram nesta longa caminhada.

À praxe, por me tornar uma pessoa melhor, e por me incutir valores, indispensáveis para encarar esta próxima etapa.

*“Strength does not come from physical capacity. It comes from an
indomitable will”*

Mahatma Gandhi

Índice

I. Abstract/Key words.....	1
II. Resumo/Palavras-chave.....	2
II. Introdução.....	3
IV. Materiais e Métodos.....	4
V. Nicotina.....	5
• História.....	5
• Composição química do tabaco.....	6
• Farmacocinética da nicotina.....	7
• Mecanismo de ação e efeitos sistêmicos.....	8
VI. Tecido ósseo.....	9
• Metabolismo ósseo.....	9
• Osteoblastos.....	10
• Osteócitos.....	10
• Osteoclastos.....	11
VII. Efeito da nicotina no metabolismo ósseo e suas consequências na regeneração óssea.....	12
• Efeito da nicotina no metabolismo ósseo.....	12
• Nicotina e a Doença Periodontal.....	14
• Efeito da nicotina na osteointegração.....	16
VIII. Conclusão.....	20
IX. Referências Bibliográficas.....	21
X. Anexos	

Abstract

Over the past few years increasing attention has been taken to the harmful effects that smoking can have on oral health. Aesthetic increasingly begins to be a factor to be taken into consideration for those looking for expert help at the Dentist, and rehabilitation with dental implants are beginning to be a common choice for patients. Therefore, it is necessary to discover the factors that can lead to implant failure. Another aspect to consider is periodontal disease, which, in order to reduce the catastrophic effects to the periodontium, has been widely studied, mainly at the level of its promoting factors. The study of tobacco-related harm when related to their interaction with bone metabolism can provide meaningful responses, in the establishment of potential cures of periodontal disease, as well as to an increase in the success rate in the osseointegration of dental implants.

This work aims to develop and integrate possible relationships between the main component of tobacco, nicotine, and its effect on the bone metabolism, focusing essentially on its effect in the cells of the bone tissue. In this way, it is also tried to realize if this is the only, or at least the main responsible for the harmful effects of tobacco on the success of implant placement, or in the worsening of periodontal disease.

Key words

Dental Implants, Nicotine, Osseointegration, Osteoblasts, Osteoclasts, Periodontal disease, Tobacco

Resumo

Ao longo dos últimos anos, uma atenção crescente tem-se vindo a focar nos efeitos nocivos que o tabaco pode ter para a saúde oral. Cada vez mais a estética começa a ser um fator a ter em conta para todas as pessoas que procuram ajuda especializada no Médico Dentista, e cada vez mais se recorre a reabilitação com implantes dentários. Assim sendo, sentiu-se a necessidade de descobrir os factores que podem levar ao fracasso dos mesmos. Outro aspeto a ter em consideração é a doença periodontal que, de forma a reduzir os seus efeitos catastróficos para o periodonto, tem sido amplamente estudada, principalmente ao nível dos fatores que a potenciam. O estudo dos efeitos nocivos do tabaco, quando relacionados com a sua interação com o metabolismo ósseo, podem dar respostas significativas, no estabelecimento de potenciais curas da doença periodontal ou num aumento da taxa de sucesso na osteointegração de implantes dentários.

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo desenvolver e integrar possíveis relações entre o principal componente do tabaco, a nicotina, e o seu efeito no metabolismo ósseo, incidindo essencialmente sobre o seu efeito nas células do tecido ósseo. Desta forma, tenta-se assim perceber se esta é a única ou, pelo menos, a principal responsável pelos efeitos nocivos do tabaco no sucesso da colocação de implantes ou no agravamento da doença periodontal.

Palavras chave

Doença periodontal, Implantes dentários, Nicotina, Osteointegração, Osteoblastos, Osteoclastos, Tabaco.

Introdução

Nos dias de hoje, fumar é considerado um hábito comum. Contudo, várias ações têm sido tomadas de modo a sensibilizar as pessoas para os perigos que o tabaco pode trazer para a saúde do fumador e dos que o rodeiam. (1, 2)

Fumar é o fator de risco modificável com o maior número de mortes atribuídas. (3) Os efeitos no sistema cardiovascular já são bem conhecidos e estes efeitos estão também relacionados com a etiologia de muitos câncros, como o cancro do pulmão, sendo também a causa direta ou provável de outros (e.g. cavidade oral, laringe, esófago). O tabaco tem sido implicado na patogénese de numerosas doenças que afetam diferentes tecidos do organismo, sendo que a nicotina, a substância principal entre as mais de 4000 substâncias presentes no tabaco, aparece como potencialmente causadora de muitas dessas patologias. (3-7)

A nível da cavidade oral, o efeito do tabaco é exercido sobre a microcirculação, produzindo uma redução da irrigação e, conseqüentemente, sobre a nutrição da gengiva e osso. Estes factores vão levar ao aumento do risco de aparecimento ou agravamento da lesão periodontal, assim como podem influenciar na osteointegração de implantes dentários. (3, 4, 6, 7)

O osso é um tecido conjuntivo especializado, endurecido pela mineralização da matriz extracelular com fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatite ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{Ca}(\text{OH})_2$). (8, 9)

As células ósseas são responsáveis pela correta formação óssea, onde os osteoblastos têm a função de formar osso e os osteoclastos a função contrária, isto é, destruir osso. Esta perfeita harmonia permite que em casos pós cirúrgicos ou ortodônticos, ocorra uma perfeita remodelação óssea das áreas envolvidas. (10)

Uma vez que fumar está intimamente associado a uma má cicatrização óssea, gengivite, periodontite, e falha na osteointegração de implantes dentários (11), este trabalho tem como objetivo tentar estabelecer uma relação entre a presença de nicotina no organismo e as alterações resultantes da mesma, a nível da regeneração óssea, avaliando para isso, as alterações que ocorrem a nível das células responsáveis pelo seu metabolismo.

Será também analisada a relação da nicotina com o aparecimento e/ou agravamento da doença periodontal (gengivite e periodontite), e também a interação desta molécula, no sucesso implantar, isto é, se a presença da nicotina influencia ou não na osteointegração de implantes dentários.

Esta revisão permitirá aos profissionais Médicos Dentistas, obterem informação importante e

condensada sobre os efeitos da nicotina ao nível do metabolismo ósseo, e assim transmitir de forma mais fácil aos seus pacientes, as informações relevantes, e desta forma combater o tabagismo com o objetivo de proporcionar uma melhor qualidade de vida aos seu pacientes, bem como uma taxa de sucesso superior nos seus tratamentos.

Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho de revisão foram pesquisados artigos científicos em bases de dados destinadas a esse fim, nomeadamente a PubMed. Foram utilizadas diferentes combinações de palavras-chave relevantes, tais como nicotine, bone metabolism, tobacco, periodontal disease, endosseous implants e bone cells. Artigos relevantes publicados em inglês entre 1995 e 2013 foram selecionados e analisados.

1. Nicotina

História da Nicotina

A palavra nicotina é originária da planta do tabaco *Nicotiana tabacum* e é proveniente da América do Sul. Esta planta era cultivada pelos nativos que fumavam rolos feitos das suas folhas, sendo o seu extrato utilizado como inseticida . (4-6)

A viagem de Colombo ao Novo mundo, levou a que os colonizadores europeus observassem os costumes dos nativos, o cultivo, o ato de mascar e de fumar tabaco, o que fez com que esta planta fosse levada para o continente Europeu, espalhando o ato de fumar por toda a Europa durante o século XVI . (5)

Foi em Inglaterra que surgiu pela primeira vez uma campanha antitabagista, no início do século XVII, levada a cargo por James I. Tal facto fez com que o Parlamento lançasse um imposto substancial sobre o tabaco o que levou a um conflito entre o interesse económico do tabagismo e as advertências enfáticas acerca dos seus perigos. (5)

Os estudos de Nicot sobre os efeitos da nicotina levaram-no a recomendar o seu uso, considerando que a substância “curava tudo”. Devido às alegadas propriedades curativas das sementes e da planta ocorreu uma rápida expansão da prática de fumar por todo o mundo. (5)

Inicialmente, o consumo de tabaco era levado a cabo através do uso de cachimbos, charutos e através do ato de mascar as suas folhas e apenas era consumido por homens. Só a partir da última década do século XIX é que se iniciou a produção de cigarros, sendo atualmente responsáveis por 90% do consumo de tabaco. (5, 7)

A popularidade do tabaco iniciou-se após os século XX, devido à sua maior disponibilidade e a um aperfeiçoamento dos instrumentos de produção em massa. A expansão do seu consumo deu-se principalmente durante a Primeira Guerra Mundial, havendo um aumento superior após a Segunda Guerra Mundial. (5)

Por volta dos anos 70 houve uma diminuição acentuada de 50% do consumo de cigarros no Reino Unido, causada por factores como aumento do preço e publicidade adversa. (5)

Composição química

A composição química do tabaco varia consoante a sua fonte de origem, isto é, conforme o tipo de folhas de tabaco do qual é extraído, assim como a forma como essas mesmas plantas são cultivadas, a sua região de cultivo e as suas variações de temperatura, além das características de preparação.

(5)

O fumo do tabaco, tem um potencial tóxico extremamente nocivo para a saúde, tendo sido já isoladas a partir dele cerca de quatro mil substâncias tóxicas diferentes, provenientes do fumo, estando entre elas, venenos como o monóxido de carbono, substâncias psicoactivas, toxinas como radicais livres oxigenados, substâncias como a nitrosamina, que apresentam propriedades carcinogénicas, e outras substâncias indutoras do vício, sendo a mais importante, a nicotina. Estas últimas apresentam efeitos reforçadores positivos, contribuindo para o aumento da dependência ao tabaco. (5, 12, 13)

O fumo do tabaco é composto por duas fases: a fase gasosa, contendo componentes como monóxido de carbono, azoto, nitrosaminas, álcoois e aldeídos, entre outros, que produzem efeitos indesejáveis para a saúde do indivíduo; e a fase particulada composta por substâncias como nicotina, água e alcatrão. (5)

A nicotina, é um componente natural que atua como um insecticida nas folhas de tabaco, sendo o seu principal alcalóide (14). Esta substância apresenta, no ser humano, um potencial tóxico que leva à alteração de algumas funções tecidulares, devido à sua disseminação através da corrente sanguínea mas também pela sua fácil e rápida absorção pelos tecidos moles da cavidade oral e grande capacidade de adesão às peças dentárias. (5, 13)

Como alcalóides *minor* mais abundantes, salientam-se a nornicotina e a anatabina, seguidas da anabasina. A maior parte destes alcalóides surgem por ação bacteriana ou por oxidação durante o processamento do tabaco e não por processos biossintéticos que possam ocorrer na planta viva, onde se encontram outros alcalóides endógenos, tais como a miosmina, N-metilmiosina, cotinina, nicotirina, entre outros. (14) A miosmina encontra-se também presente em alimentos tais como nozes, leite ou batata, e a nicotina, embora em níveis baixos, encontra-se presente em vegetais tais como tomates e beringelas. (14)

Farmacocinética

A nicotina é uma amina terciária constituída por uma piridina e um anel pirrolidina, sendo um alcaloide líquido natural. Esta substância é uma base volátil amarela que, quando em contacto com o ar, altera a sua cor para castanho e ganha o odor característico do tabaco tendo um tempo de semi-vida de cerca de duas horas. (5)

A nicotina quando absorvida pelo trato respiratório, mucosas orais e pele, entra na circulação arterial e é rapidamente distribuída pelos tecidos do corpo, atingindo o cérebro num intervalo de 10 a 20 segundos. (5, 12, 14)

A absorção da nicotina através das membranas biológicas é condicionada pelo pH do meio. Sendo esta molécula uma base fraca com um pKa de 8,0, apresentará uma maior dificuldade em ultrapassar as membranas quando no seu estado ionizado ou em ambientes de pH ácido. (5, 6, 14)

O pH do fumo “*flue-cured*” encontrado na maioria dos cigarros é ácido (pH de 5,5-6,0) e a este pH, a nicotina encontra-se principalmente no estado ionizado. Consequentemente, ocorre pouca absorção oral da substância nos cigarros comuns, mesmo quando o fumo é mantido na boca. Já no fumo do tabaco “*air-cured*”, presente nos charutos, cachimbos e alguns cigarros europeus, o seu pH é mais alcalino (pH de 6,5 ou superior), existindo assim uma considerável quantidade de nicotina não ionizada, o que facilita a sua absorção via oral. (14)

Quando a nicotina atinge os alvéolos é rapidamente absorvida e a sua concentração na corrente sanguínea aumenta rapidamente durante o ato de fumar, atingindo o seu pico mais alto no fim do mesmo. (5, 14)

No caso do trato respiratório, a absorção da substância acontece rapidamente devido à grande área de superfície dos alvéolos e pequenas vias aéreas e devido a dissolução da nicotina no fluido de pH 7,4 do pulmão humano, facilitando a sua transferência pelas membranas. (6, 14)

Cerca de 70 a 80% da nicotina é metabolizada em cotinina e esta pode ser encontrada no sangue, urina, saliva, cabelo e unhas sendo o biomarcador mais importante da nicotina. (5, 14)

A nicotina é principalmente metabolizada por enzimas hepáticas CYP2A6, UDP-glucuronosyltransferase (ugt) e flavina monooxygenase (FMO) (5, 14)

Mecanismo de ação e feitos sistêmicos.

A nicotina liga-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) exercendo a sua ação farmacológica. Esses receptores são canais iônicos dependentes de ligante e são compostos por cinco subunidades proteicas dispostas simetricamente como “pautas em torno de um barril”, existindo no sistema nervoso central nas bordas das pregas da junção neuromuscular e nos gânglios pós-sinápticos do sistema parassimpático. A sua ativação ocorre por ligação à acetilcolina que é libertada durante as sinapses. (5, 15, 16)

A administração crônica de nicotina leva a um grande aumento do número de receptores nicotínicos da acetilcolina o que pode levar a uma resposta adaptativa à dessensibilização prolongada do receptor. (5, 16)

Assim como dito anteriormente, a nicotina vai ter efeitos sistêmicos no organismos.

A nível do Sistema Nervoso Periférico a principal ação da nicotina consiste inicialmente num estímulo transitório e, posteriormente, de uma mais persistente depressão de todos os gânglios autónomos. A nicotina possui também uma ação bifásica, isto é, em doses baixas provoca a descarga de catecolaminas, e em altas doses impede a sua libertação em resposta à estimulação do nervo esplâncnico. A nicotina assim como a acetilcolina é conhecida por estimular um número de receptores sensoriais. (5, 6)

A nível do Sistema Nervoso Central (SNC), existe um acentuado estímulo por parte da nicotina, que em doses baixas produz analgesia fraca enquanto que em doses altas provoca tremores, podendo levar a convulsões em doses tóxicas. Os locais de principal ação da nicotina no SNC são do tipo prejuncional, causando a libertação de outros neurotransmissores e, nesse sentido, podemos considerar que as ações estimulantes e de prazer da nicotina parecem resultar da libertação de aminoácidos excitatórios, dopamina e outras aminas biogénicas de vários centros do SNC. (5, 6)

Quanto ao sistema cardiovascular, a nicotina estimula os gânglios simpáticos e a medula adrenal, levando a uma descarga de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas. Também contribuindo para a resposta simpaticomimética à nicotina na ativação de quimiorreceptores dos corpos carótidos e da aorta, resultando em vasoconstrição, taquicardia e pressão arterial elevada. (5, 6)

No que diz respeito às glândulas exócrinas, a nicotina causa uma estimulação inicial das secreções salivares e brônquicas que é seguidamente inibida. (5, 6)

2. Tecido ósseo

Metabolismo ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado, endurecido pela mineralização com fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatite ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{Ca}(\text{OH})_2$). As funções do osso são já bem conhecidas, sendo elas, fornecer rigidez e forma, proteção e apoio para as estruturas do corpo e auxiliar a locomoção. Este tecido é na verdade uma estrutura altamente dinâmica em constante remodelação e o seu *turn-over* permite que exista uma reparação eficaz após fratura ou por motivos ortodônticos, havendo dessa forma uma constante remodelação óssea. (8, 9)

Existem dois tipos histológicos de osso maduro, sendo eles o osso cortical ou compacto, que é denso e apresenta uma estrutura ordenada; e o osso trabecular ou esponjoso, que é mais leve, menos compacto e tem uma estrutura irregular. O osso compacto ou cortical é encontrado principalmente no eixo de ossos longos e nas superfícies de ossos achatados. É composto por osso definido concentricamente ao redor de canais centrais, conhecidos como sistemas Haversian. Estes canais contêm vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e tecido conjuntivo. Uma camada concêntrica de anéis ou lamelas de matriz óssea rodeia cada canal de Haversian, e dentro dessas lamelas existem espaços minúsculos, denominados de lacunas, contendo osteócitos(9, 10)

Em relação ao osso trabecular ou esponjoso, este é menos abundante, localizando-se nas extremidades dos ossos longos e no interior dos ossos achatados. Este contém trabéculas que se encontram alinhadas ao longo das linhas de tensão. A distribuição anatômica específica do osso trabecular é ideal para suportar a tensão de compressão e, portanto, é o osso predominante nas vértebras. (9, 10)

Um elemento muito importante na estrutura óssea é a sua rede de colagénio. Na idade adulta, as fibras de colagénio adoptam uma orientação preferencial resultando na formação de osso lamelar. No osso cortical as lamelas são arranjadas concentricamente, enquanto que no osso trabecular estas encontram-se paralelas umas as outras. (9, 10)

De um modo geral, cada osso tem uma camada externa de osso cortical sobrejacente ao osso trabecular e sua cavidade medular. O osso cortical possui uma membrana externa denominada de perióstio, e este por sua vez apresenta duas camadas, uma camada fibrosa externa e uma interna, que apresenta potencial osteogénico, permitindo a formação de novo osso e levando, assim, à sua

ampliação, um processo denominado como aposição periosteal. A superfície interna do córtex tem outra camada chamada de endósteo que contém osteoblastos e osteoclastos, juntamente com os seus progenitores. Estes dois tipos celulares ósseos funcionam de forma coordenada, formando e reabsorvendo osso, ocorrendo assim a sua remodelação, crescimento e reparação. (8, 9)

A taxa de remodelação óssea varia de acordo com o tipo de osso, sendo maior em locais onde o osso trabecular predomina, como vértebras, e menor em locais ricos em osso cortical, como o quadril. (8, 9)

Osteoblastos

Os osteoblastos derivam de células mesenquimatosas que sofreram um processo de maturação e apresentam um papel muito importante na criação e manutenção da arquitetura esquelética. Estas células são responsáveis pela deposição de matriz óssea e regulação da diferenciação e atividade osteoclástica. (8, 9, 17)

Os osteoblastos são células mononucleadas que quando ativas apresentam o complexo de Golgi e retículo endoplasmático bem visíveis. Além disso, os osteoblastos encontram-se ligados uns aos outros por junções e apresentam zonas especializadas em secreções e tráfego vesicular. À medida que se diferenciam ganham capacidade de produzir matriz óssea. (8)

Desempenham também um papel de grande importância na regulação da reabsorção óssea, interagindo com o pré-osteoclasto e induzindo ou inibindo a sua diferenciação, considerando-se desta forma, que regulam a formação e atividade osteoclástica. (8, 17)

Osteócitos

Alguns osteoblastos acabam por ficar enclausurados na sua própria matriz óssea dando origem aos osteócitos que, de forma gradual, deixam de secretar a matriz orgânica do tecido ósseo (osteóide). (8)

Os osteócitos são as células mais abundantes do osso, correspondendo a cerca de 90% das células ósseas num adulto e comunicam entre si e com o meio envolvente através de extensões da sua membrana plasmática. (8, 9)

Assim sendo, estas células tem como função atuar como mecanoreceptores, instruindo os osteoclastos onde e quando reabsorver osso e os osteoblastos onde e quando formar novo osso. (8, 9)

Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas que são responsáveis pela reabsorção óssea. A reabsorção osteoclástica consiste em vários processos, tais como: desenvolvimento dos osteoclastos a partir das células hematopoiéticas progenitoras; ligação dos osteoclastos à superfície do osso; secreção de ácido e enzimas lisossomais para o tecido ósseo subjacente ao osteoclasto (lacuna de reabsorção). (17)

A formação e atividade osteoclástica é regulada principalmente pelos osteoblastos através de duas moléculas: o *receptor activator of nuclear factor – kb ligand* (RANKL), que interage com o seu receptor RANK, que se encontra expresso na superfície do pré-osteoclasto, induzindo a diferenciação e fusão destas células; por outro lado, os osteoblastos secretam um receptor solúvel para o RANKL, a osteoprotegerina (OPG), que bloqueia a interação RANK/RANKL, prevenindo assim a diferenciação e ativação do osteoclasto. O balanço entre RANKL e OPG determina a formação e atividade osteoclástica. (8, 17)

3. Efeitos da nicotina no metabolismo ósseo

Efeito da nicotina nas células ósseas

A nicotina é conhecida por interferir no comportamento normal das células ósseas, comportamento esse indispensável para um correto metabolismo ósseo.

Segundo Henemyre, Scales, Hokett, *et al.* (12), recorrendo a células da medula óssea suína, o aumento da concentração de nicotina promove um aumento do número de células multinucleadas (osteoclastos). A importância desta descoberta encontra-se no facto do aumento dos níveis de nicotina não estar relacionado com uma estimulação da morte celular, ou com um aumento da sua citotoxicidade, complementando a informação já reportada por Pabst *et al.* que defende que a nicotina não afeta a viabilidade dos neutrófilos ou monócitos. Segundo estes autores, a nicotina pode ser considerada um inibidor de apoptose das células ósseas, assim como os bisfotonatos e a calcitonina, o que explicaria o aumento do número de células multinucleadas encontrado nesse estudo.

S.Yuhara *et al.* (17) através dos seus estudos, mostra precisamente o contrário, considerando assim que a nicotina regula a diferenciação e mineralização das celas osteoblásticas e inibe a diferenciação e ativação das células osteoclásticas. Dessa forma, é proposto que a nicotina favorece de forma positiva o metabolismo óssea, ponderando que a perda óssea causada pelo tabaco esteja relacionada com outra substância deste, tal como o alcatrão, óxido nítrico, nitrosaminas e quinonas, que podem interagir com a nicotina e alterar os seus efeitos ao nível do metabolismo do osteoclasto, produzindo resultados diferentes dos obtidos nos seus estudos *in vitro*.

Pereira *et al.* (18), realizou um trabalho com o objetivo de analisar o efeito da nicotina na proliferação e atividade funcional das células osteoblásticas na superfície de implantes de titânio. Este estudo levou à conclusão que o comportamento das células osteoblásticas humanas, quando em contacto com os implantes de titânio pulverizado de plasma, é afetado pela contínua exposição à nicotina. Os resultados obtidos através deste estudo levaram os autores a concluir que existe a possibilidade de uma modulação direta da atividade osteoblástica, sendo considerada um fator que contribui para o efeito total da nicotina no microambiente de osso ao redor dos implantes dentários.

Saldanha *et al.* (4), investigaram o efeito do tabagismo sobre a dimensão do processo alveolar e da densidade óssea radiográfica de 21 pacientes, onde 11 eram não fumadores e os restantes 10 fumadores, após a extração de molares. Verificaram a redução da altura alveolar e uma densidade óssea radiográfica mais pronunciada em fumadores do que em não fumadores. Os autores propuseram que o ato de fumar leva ao aumento da reabsorção nas extremidades fraturadas interferindo com a função osteoblástica.

Segundo David E. Rothem *et al.* (19), a nicotina atua através da ligação a nAChR, levando a um aumento ou diminuição da regulação de genes regulatórios de osteoblastos e assim suprime a osteogénese, promove a reabsorção óssea retardando a diferenciação de osteoblastos. O objetivo do seu estudo foi encontrar os genes que regulam processos do metabolismo ósseo, nos quais a sua expressão é afetada pela ação da nicotina. Assim, foi explorado se a nicotina afeta a proliferação celular, bem como a expressão de osteocalcina, colagénio e fosfatase alcalina, em células osteoblásticas humanas MG63. Os resultados obtidos com este estudo mostraram um efeito bifásico; efeitos tóxicos e antiproliferativos a quando de uma alta concentração de nicotina e efeitos estimulatórios em baixos níveis da mesma. Adicionalmente, ficou demonstrada a inibição do efeito da nicotina pela D-tubocurarina, o que sugere que a nicotina atua através do nAChR, considerando-se assim que a nicotina pode ter efeitos críticos na osteogénese. De forma resumida, os estudos de David E. Rothem *et al.* demonstram que uma concentração baixa de nicotina leva a um aumento da proliferação de osteoblastos e da expressão de genes importantes para o metabolismo ósseo, enquanto concentrações elevadas originavam efeitos contrários.

Os estudos realizados por Ma L *et al.* (20), pretendiam avaliar a influência da nicotina na proliferação e expressão genética dos mediadores osteogénicos e angiogénicos dos osteoblastos. Este estudo usou células osteoblasticas de coelho e não células humanas levando a resultados contraditórios com outros autores que usaram apenas células humanas. Sendo assim, Ma L *et al.* concluiu que a nicotina tem uma ação direta na inibição da proliferação, e na expressão dos mediadores osteogénicos e angiogénicos na atividade osteoblástica, que pode contribuir para o insucesso na osteointegração do implante dentário.

Machado *et al.* (21) realizou um estudo onde tentou descobrir a ação da nicotina e ovariectomia na regeneração óssea, após extração dentária em ratos. A diminuição da concentração de estrogénio causada pela ovariectomia leva um aumento da produção de IL (1 e 6), que estimulam a atividade osteoclástica, originando uma maior reabsorção óssea e perda dentária, principalmente quando

diretamente relacionada com a doença periodontal. É importante ter em conta que os estrogénios atuam na produção de factores que regulam a diferenciação, metabolismo e atividade osteoblástica levando a uma reparação do tecido ósseo lesado. A nicotina, segundo Fang *et al*, em doses moderadas, leva à inibição da proliferação de células “osteoblast-like”, sugerindo que esta droga exerce um efeito direto nas células ósseas. Este estudo demonstra que existe uma diminuição da formação de novo osso desencadeada pela presença de nicotina e ovariectomia, possivelmente potenciada pela associação ovariectomia-alcaloide, resultando num atraso significativo na diferenciação do tecido ósseo e na sua maturação além de outros eventos importantes na reparação do alvéolo dentário. É também sugerido que o tratamento dentário em mulheres fumadoras e/ou em menopausa podem refletir-se em infeção cirúrgica e num atraso no reparo da ferida cirúrgica após extração dentária, devido à associação dos baixos níveis de estrogénios com a nicotina.

Verifica-se assim que existem resultados contraditórios nos vários dos estudos analisados, o que leva a concluir que serão necessários mais estudos, possivelmente *in vitro* com células humanas e *in vivo*, para que se consiga determinar com certeza, a verdadeira interação entre a nicotina e as células ósseas, e se essa interação interfere nas atividades celulares que estão na base do metabolismo ósseo.

Nicotina e Doença Periodontal

O consumo de tabaco é reconhecido como sendo um fator de risco significativo para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal. O seu uso está associado com um aumento de bolsas periodontais, perdas de inserção periodontal, perdas ósseas alveolares e um aumento da taxa de perda de dentes. A literatura disponível sugere que a nicotina afeta o fluxo sanguíneo gengival, a produção de citocinas, o recrutamento e ativação de neutrófilos, bem como a função de outras células imunitárias. (4, 6, 7, 22)

O periodonto consiste no tecido que rodeia e suporta o dente. Este é constituído por ligamento periodontal, gengiva, cemento radicular e osso alveolar. O ligamento periodontal é constituído por fibroblastos, elementos neurovasculares, células epiteliais, cementoblastos, osteoblastos e seus precursores. O ligamento periodontal também apresenta uma quantidade significativa de matriz extracelular, composta por colagénio, glicosaminoglicanos e outras proteínas não colagénicas.(7, 23)

Uma importante função do cemento radicular é a de servir como âncora para as principais fibras do ligamento periodontal que funcionam como uma malha localizada entre a raiz e o osso alveolar, até

à raiz. O cimento participa também na manutenção da adaptação oclusal, na reparação dos defeitos da raiz após reabsorção ou fratura e confere proteção para a polpa. (7, 23)

A doença periodontal, que inclui gengivite e periodontite, é uma patologia bacteriana comum nos humanos, que afeta tanto as gengivas como o osso de suporte dos dentes. A gengivite consiste numa forma de inflamação limitada apenas aos tecidos gengivais marginais, sendo normalmente causada pela acumulação dento-gengival de placa bacteriana, por falta de uma correta higiene oral. Esta doença é reversível quando tratada quer no consultório, quer com uma boa higiene oral em casa. Quando a gengivite não é tratada, esta pode avançar para periodontite em certas condições quando a placa se acumula abaixo da linha gengival. A periodontite consiste numa inflamação destrutiva que resulta numa perda irreversível de ligamento periodontal e de osso alveolar de suporte. (6, 7, 24)

A gengivite necrosante aguda encontra-se significativamente correlacionada com o uso de tabaco, embora a causa exata desta doença seja ainda desconhecida. Alguns dos pacientes com esta patologia apresentam uma função neutrofílica defeituosa, permitindo assim uma invasão bacteriana, ou possivelmente viral (citomegalovírus), dos tecidos gengivais. (7, 22)

O sangramento gengival nos fumadores é menos grave do que em não fumadores, o que pode estar relacionado com o efeito vasoconstritor da nicotina, sendo que a principal ação vasoconstritora desta substância é exercida ao nível da vasculatura arterial terminal da gengiva. Outros componentes do tabaco podem também induzir necrose tecidular e ulcerações associadas a esta doença. (6, 7, 22)

A nicotina inibe a proliferação de fibroblastos gengivais e a produção de fibronectina e colagénio por parte dos mesmos, aumentando a produção de collagenase. Além disso, os leucócitos orais, principalmente os neutrófilos, podem apresentar uma menor capacidade de migração e fagocitose, contribuindo desta forma para a inativação dos inibidores de protease. (7, 22)

O ato de fumar leva a um aumento na regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a Interleucina-1, contribuindo assim para o aumento da lesão tecidular e reabsorção de osso alveolar. Fumadores com genótipo positivo para Interleucina-1 encontram-se mais suscetíveis para periodontite grave (forma adulta). (6, 7, 22)

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que o tabagismo constitui um risco significativo para o desenvolvimento da doença periodontal e que a gravidade desta doença aumenta com o aumento da frequência do ato de fumar. É também importante referir que os fumadores têm uma maior acumulação de cálculo nas superfícies dentárias do que os não fumadores e que a quantidade de cálculo presente também está correlacionada com essa frequência. Quase metade dos casos de

periodontite nos Estados Unidos devem-se ao consumo de tabaco e os fumadores apresentam um risco 2,5 a 3,5 vezes maior de perda grave do ligamento periodontal através desta doença. (7)

Outros fatores de risco para a destruição do periodonto, tais como, stress emocional e uma fraca higiene oral, são potenciados pelo consumo de tabaco. (6, 7, 22, 23)

Pindborg (1947) foi um dos primeiros investigadores a estudar a relação entre doença periodontal e tabagismo. Segundo Pindborg, nos fumadores existia uma maior prevalência da gengivite ulcerativa necrosante aguda. Estudos iniciais mostraram que os fumadores apresentavam níveis mais elevados de periodontite, mas estes tinham também níveis mais baixos de higiene oral e níveis mais elevados de tártaro. (6)

Num estudo realizado a cerca de 889 pacientes espanhois, as componentes recessão gengival, profundidade e nível de inserção foram significativamente associadas com o tabagismo. (6)

Estudos realizados por Tomar *et al.* , e Beck *et al.* (4), demonstraram que a periodontite é mais comum em fumadores do que não fumadores, tendo também os fumadores maior perda óssea alveolar.

Muitos estudos referem que existe uma relação direta entre a presença de nicotina no organismo e o aparecimento/progressão da doença periodontal. No entanto, convém referir que a interferência de outros fatores como a placa bacteriana aumentam o risco do agravamento da doença.

Efeito da nicotina na osteointegração de implantes dentários

A reabilitação protética através da utilização de implantes osteointegrados tem mostrado ser uma excelente opção para o tratamento de pacientes edêntulos totais ou parciais. (13)

Contudo, como todas as outras opções de reabilitação protética, apresenta diversas vantagens e desvantagens nas quais condições sistémicas e locais que cada paciente pode apresentar, podem interferir com a osteointegração do implante, levando ao seu insucesso e posterior perda. (13)

O tabaco e, mais especificamente a nicotina, têm sido estudados como grandes intervenientes no fracasso da osteointegração dos implantes dentários, devido aos seus efeitos já conhecidos na cavidade oral, tais como, maior risco de cancro oral, doença periodontal, leucoplasia, estomatite nicotínica e hemorragia gengival, assim como, a sua atividade negativa na cicatrização de feridas devido aos seus efeitos na resposta inflamatória e, consequentemente, na vascularização. (13, 25)

É assim importante verificar a diferença sobre o índice de sobrevivência dos implantes em dois grupos de pacientes, os fumadores e os não fumadores. (13, 25)

Verificou-se que o tabaco contribui para um aumento da mobilidade dentária e consequente perda, com uma incidência de 1,53 vezes mais frequente nos fumadores do que em não fumadores. Consequentemente, a perda dentária reduz a capacidade de mastigação e diminui a qualidade de vida, levando à necessidade de recorrer a meios de reabilitação protética, tais como, próteses totais ou parciais e implantes unitários ou como pilares de prótese. (7, 13)

A peri-implantite consiste na formação de bolsas profundas da mucosa ao redor dos implantes dentários, inflamação dos tecidos peri-implantares e a uma maior reabsorção ao redor dos implantes. A peri-implantite crônica resulta no fracasso da osteointegração do implante quando não tratada. (7, 26)

A osteointegração de implantes dentários, essencial para o sucesso a longo prazo, relaciona-se diretamente com a capacidade de ancoragem do implante pela formação de osso sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante, e representa um processo dinâmico, tanto durante a sua criação como na sua manutenção. Embora a taxa de sucesso da osteointegração dos implantes seja alta, os fracassos também ocorrem sendo que o tabaco é um dos fatores frequentemente associados aos mesmos. (2)

O uso do tabaco pode diretamente comprometer a osteointegração dos implantes dentários. Sabe-se que a diferença de perda de tecido ósseo é bastante considerável na mandíbula entre fumadores e não fumadores mas insignificante na maxila entre os dois grupos considerados. A combinação entre o ato de fumar e uma grande acumulação de placa bacteriana que por sua vez induz uma excessiva inflamação dos tecidos circundantes, influencia significativamente a perda óssea ao redor dos implantes, enquanto a carga oclusal tem um papel menos importante no fracasso implantar. (7, 26) Neste contexto, é importante referir que existem diferenças significativas na sobrevivência implantar associada ao ato de fumar, havendo um insucesso superior em fumadores do que em não fumadores. Num estudo verificou-se que a percentagem de insucesso era de 11,28% contra 4,76%, respectivamente. (7, 13)

Wallace *et al.* (7, 13) demonstrou uma taxa de insucesso de 16,6% em fumadores, comparativamente a uma taxa de insucesso de 6,9% em não fumadores, num estudo realizado recorrendo a 56 pacientes e utilizando 187 implantes num período de tempo de 4 anos. Neste estudo a taxa de falhas antes da colocação do implante foi de 9% em fumadores e de 1% em não

fumadores, o que é estatisticamente significativo, mesmo que a qualidade óssea de ambos os grupos tenha sido comparável.

Kourtis *et al.* (13) analisaram retrospectivamente 1692 implantes de diferentes fabricantes, colocados em 405 pacientes onde 50,4% desses implantes foram instalados em 201 pacientes fumadores e 49,6% colocados nos restantes 204 pacientes não fumadores. Como resultado, o fumo aumentou a falha implantar de modo estatisticamente significativo, tendo sido concluído que o tabaco foi o fator mais importante associado com as falhas biológicas dos implantes.

Lemmerman *et al.* (13) analisaram durante 8 anos um total de 1003 implantes dentários de titânio, os quais foram colocados pelo mesmo dentista recorrendo ao mesmo protocolo. Os resultados obtidos demonstram que as taxas de sucesso foram estatisticamente influenciadas pelo tempo de vida do implante. Fatores, tais como, a idade do paciente, o sexo, o local de colocação, o tipo ósseo, o diâmetro do implante ou da sua superfície, e o ato de fumar não afetaram significativamente o sucesso do implante. Este estudo longitudinal concluiu assim que a taxa de insucesso da osteointegração dos implantes varia de acordo com alguns fatores relatados anteriormente, dos quais apenas a idade do implante foi estatisticamente definitiva para a falha do mesmo e não o facto do paciente ser fumador ou não.

E. V. Soares *et al.* (25) usaram ratos como modelo experimental para o estudo dos efeitos de consumo de álcool e nicotina nos tecidos orgânicos, apresentando características semelhantes aos seres humanos. Após a realização do estudo concluíram que o consumo de álcool ou nicotina em separado remetem para uma osteogénese reduzida em torno do implante. O seu consumo em simultâneo intensifica estes efeitos, levando a que o osso tenha uma resistência mecânica mais reduzida. Assim, o consumo destas duas substâncias é considerado como um importante fator para o insucesso da reabilitação oral.

K. Gotfredsen *et al.* (11) realizaram um estudo com o objectivo de analisar o efeito a longo prazo de exposição de nicotina (6 meses) na remodelação óssea e osteointegração de implantes de titânio. Apesar de não existirem diferenças no “*removal torque test*” (RMT) entre o grupo de teste e o grupo de controlo, existiu um aumento significativo no RMT entre a 2ª e a 44ª semana em cada grupo. O estudo realizado demonstra que não existiu relação entre a exposição prolongada de nicotina e a osteointegração dos implantes de titânio .

Um estudo experimental realizado no fémur e tibia de coelhos por D. Balatsouka *et al.* (27) com o objectivo de analisar o impacto da nicotina na osteointegração recorrendo a grandes doses de

nicotina num curto espaço de tempo, obteve resultados semelhantes ao trabalho descrito anteriormente, não se verificando alterações após realizar o RMT entre o grupo de controlo e o grupo de teste. Foi concluído que a exposição à nicotina num curto espaço de tempo, mesmo que em grandes doses, não causou impacto significativo na osteointegração dos implantes nos coelhos.

J. Berley *et al.* (28) tinham como objectivo, no estudo realizado, determinar se níveis elevados de nicotina no plasma, entregues via bombas mini-osmóticas colocadas por via subcutânea, tinham um efeito no desenvolvimento ósseo e osteointegração de um implante de titânio em fêmures de ratos, a curto e longo prazo. Neste estudo colocaram a hipótese que a nicotina sistémica pode não afetar o desenvolvimento ósseo, mas pode afetar a osteointegração em ambos os períodos referidos, embora considerem que estudos adicionais terão de ser realizados para melhorar a compreensão da forma específica como a nicotina afeta adversamente a ferida cirúrgica a nível molecular.

Também D. Balatsouka *et al.* (29) realizaram um estudo semelhante onde utilizaram coelhos para estudar o efeito da nicotina a curto prazo na cicatrização óssea e osteointegração. O seu estudo não resultou numa diferença significativa nos valores de RMT entre o grupo de controlo e o grupo de teste. Concluiu assim que a exposição à nicotina sobre um curto espaço de tempo não tinha um impacto significativo na cicatrização óssea ou na osteointegração dos implantes nos coelhos.

S. Yamano *et al.* (30) visaram compreender os efeitos da nicotina sobre a expressão génica e osteointegração de implantes de titânio em ratos. Concluíram que embora a exposição sistémica à nicotina não tenha afetado o desenvolvimento ósseo do rato, a ferida cirúrgica em torno do implante, após a sua colocação, foi afetada. Estas observações sugerem que a nicotina pode inibir a expressão de genes relacionados com a matriz óssea necessária para a cicatrização de feridas cirúrgicas, e assim diminuir a osteointegração do implante, posteriormente.

Por último, a cessação tabágica é considerada como uma atitude promissora com vista a uma melhoria da taxa de sucesso na osteointegração em fumadores que superaram o vício, com diferenças significativas entre as taxas de insucesso entre não fumadores e fumadores que adotaram o protocolo de cessação tabágica e aqueles que continuaram a fumar. (7)

Conclusão

Embora a nicotina seja considerada como uma importante, senão a mais importante substância constituinte do tabaco, estudos recentes sugerem que não será a única responsável pelos efeitos do tabagismo sobre as alterações no metabolismo ósseo.

De facto a nicotina afeta o metabolismo das células ósseas, mas como se pode verificar existem vários resultados contraditórios, considerando que esta substância apresenta efeitos estimulatórios ou inibitórios do metabolismo, o que causa uma confusão significativa. A diversidade de modelos utilizados, a proveniência das células, os protocolos de exposição à nicotina bem como a grande variedade de técnicas utilizadas dificultam o estabelecimento de padrões de resposta cientificamente robustos.

Pode-se também concluir que a nicotina tem um papel ativo na progressão da doença periodontal e da perio-implantite uma vez que o seu uso está associado com um aumento de bolsas periodontais, perdas de inserção periodontal, perdas ósseas alveolares e um aumento da taxa de perda do dente.

Foi também possível concluir que a cessação tabágica é benéfica, pois permite remover um fator prejudicial para a reabilitação oral, levando a uma melhoria quer da doença periodontal quer da osteointegração, segundo alguns estudos.

Em jeito de conclusão, serão necessários mais estudos, que devem superar as limitações existentes, como por exemplo, as diferenças entre espécies, o tipo de modelo celular utilizado, incluindo os seus estados de diferenciação e o grande número de substâncias que constituem a fase particulada do tabaco, para assim se poder atingir o verdadeiro conhecimento sobre o efeito da nicotina no metabolismo ósseo e na osteointegração de implantes dentários.

Referências Bibliográficas

1. Levin L, Schwartz-Arad D. The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. *Implant Dent*. 2005 Dec;14(4):357-61.
2. Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH. Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants. *J Biomed Mater Res A*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jan;88(1):84-93.
3. Sanchez-Perez A, Moya-Villaescusa MJ, Caffesse RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. *J Periodontol*. 2007 Feb;78(2):351-9.
4. Balaji SM. Tobacco smoking and surgical healing of oral tissues: a review. *Indian J Dent Res*. [Review]. 2008 Oct-Dec;19(4):344-8.
5. Gilmará Holanda da Cunha, Antonio Rafael Coelho Jorge, Marta Maria F. Fonteles, Francisca Cléa F. Sousa, Glaucé Socorro B. Viana, Vasconcelos SMM. Nicotina e tabagismo. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*. 2007 Outubro - Dezembro:1-10.
6. Malhotra R, Kapoor A, Grover V, Kaushal S. Nicotine and periodontal tissues. *J Indian Soc Periodontol*. 2010 Jan;14(1):72-9.
7. Sham AS, Cheung LK, Jin LJ, Corbet EF. The effects of tobacco use on oral health. *Hong Kong Med J*. [Review]. 2003 Aug;9(4):271-7.
8. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*. [Review]. 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.
9. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. [Review]. 2008 May;61(5):577-87.
10. Sakka S, Coulthard P. Bone quality: a reality for the process of osseointegration. *Implant Dent*. [Review]. 2009 Dec;18(6):480-5.
11. Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. Does longstanding nicotine exposure impair bone healing and osseointegration? An experimental study in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Nov;91(2):918-23.
12. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, et al. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1440-6.

13. Ana Carolina dos Reis Zaparoli, Larissa Ballardin, Elken Gomes Rivaldo, Luis Carlos da Fontoura Frasca, Rafael de Liz Pocztaruk, Fernandes EdL. Osseointegração Periimplantar em Pacientes Fumantes. *Stomatos*. 2006 julho-dezembro:41-8.
14. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P, 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of experimental pharmacology*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2009(192):29-60.
15. Gilman G. As bases farmacológicas da terapêutica: McGraw-Hill; 2005.
16. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, PK M. *Farmacologia*: Elsevier; 2004.
17. Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1999 Nov 3;383(3):387-93.
18. Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Gutierrez M, Fernandes MH. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. *Clin Oral Implants Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Jun;19(6):582-9.
19. Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J Bone Miner Metab*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;27(5):555-61.
20. Ma L, Zwahlen RA, Zheng LW, Sham MH. Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clin Oral Implants Res*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Mar;22(3):338-42.
21. Machado GJ, Dias SM, Bosco AF, Okamoto T, Bedran de Castro JC, Dornelles RC. Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Nov;68(11):2675-81.
22. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. [Review]. 2000;11(3):356-65.
23. Pivodova V, Frankova J, Ulrichova J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2011 Jun;155(2):109-16.
24. Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Suzuki N, Takeichi O, Katono T, et al. Lipopolysaccharide enhances the production of nicotine-induced prostaglandin E2 by an increase in cyclooxygenase-2

- expression in osteoblasts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Mar;39(3):163-72.
25. Soares EV, Favaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab*. [Comparative Study]. 2010;28(1):101-7.
 26. Haas R, Haimbock W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent*. [Comparative Study]. 1996 Dec;76(6):592-6.
 27. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Implants Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Aug;16(4):389-95.
 28. Berley J, Yamano S, Sukotjo C. The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *J Oral Implantol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;36(3):185-93.
 29. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. *Clin Oral Implants Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jun;16(3):268-76.
 30. Yamano S, Berley JA, Kuo WP, Gallucci GO, Weber HP, Sukotjo C. Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clin Oral Implants Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Dec;21(12):1353-9.